

Studies on Photoperiodic Compensation of Chlorophyll Amount and a/b Ratio Controlled by Circadian Clock Proteins in *Arabidopsis thaliana*

著者	宮田 佳奈
内容記述	筑波大学博士（理学）博士論文・平成24年3月23日授与(甲6113号)
発行年	2011
URL	http://hdl.handle.net/2241/00140228

氏 名 (本籍)	宮 田 佳 奈 (兵庫県)				
学 位 の 種 類	博 士 (理 学)				
学 位 記 番 号	博 甲 第 6113 号				
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 23 日				
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当				
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科				
学位論文題目	Studies on Photoperiodic Compensation of Chlorophyll Amount and a/b Ratio Controlled by Circadian Clock Proteins in <i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナにおける概日時計タンパク質によるクロロフィル量と <i>a/b</i> 比 の光周期補償性に関する研究)				
主 査	筑波大学准教授	博士 (理学)	溝 口 剛		
副 査	筑波大学教授	理学博士	鎌 田 博		
副 査	筑波大学教授	理学博士	佐 藤 忍		
副 査	筑波大学准教授	博士 (理学)	小 野 道 之		

論 文 の 内 容 の 要 旨

シロイヌナズナにおける概日時計の主要な構成因子である *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* と *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* の二重欠損変異体 (*lhy;cca1*) は、明暗周期がなく、常に明期の条件 (恒明条件) 下で、概日時計の機能が著しく低下する。このとき、*lhy;cca1* には、野生型 (WT) と比較して、花成遅延や胚軸・葉柄の短縮及び、濃緑色葉の形質があらわれる。しかし、概日時計が制御する花成時期や器官伸長の制御について、その分子機構は未だ十分に明らかになってはいない。また、概日時計による光合成色素量の制御機構に関しては、これまでにほとんど研究実施例がない。そこで本研究では、概日時計の下流で制御される、花成、器官伸長、クロロフィル含量、*a/b* 比に関して、概日時計の新規制御機構の解明を目指した。

LHY/CCA1 による制御系の新規な下流因子の探索を目指して、*lhy-12;cca1-101* 二重変異体種子への EMS 処理を行い、器官長短縮形質の抑圧を指標として変異体系統のスクリーニングを実施した。本変異体スクリーニングにより、PHYB の新規アليل *phyB-2511* を同定した。そして複数の *phyB* 変異 (*hy3-1*, *del1*, *phyB-2511*) により、*lhy;cca1* の短胚軸形質及び花成遅延形質が抑圧されることが分かった。*lhy;cca1* で見られる花成遅延形質は、MADS Box 型転写制御因子であり花成抑制因子である SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) タンパク質の高蓄積によることや、SVP 過剰発現体の花成遅延形質を *phyB* 変異が抑圧すること、*svp;phyB* 二重変異体の早期花成形質は各単独変異体と比較して増強されないという結果から、SVP による花成制御に PHYB が関わる可能性が示唆された。

次に、WT では異なる光周期条件下で生育させても、クロロフィル含量はほぼ一定になるが、*lhy;cca1* では 1 日あたりの明期長の増加と暗期長の減少に従い、クロロフィル含量が増加することを見出した。さらに、クロロフィル *a/b* 比も、WT は光周期条件によらずほぼ一定なのに対し、*lhy;cca1* では明期長増加と暗期長減少に伴って、*a/b* 比が低下することを見出した。このような研究報告はこれまでになく、新規な知見として、

「光周期補償性」と定義した。生化学的解析により、恒明条件下で生育させた *lhy;cca1* では、クロロフィル結合タンパク質である LIGHT HARVESTING COMPLEX II (LHC II) の量が増加することを見出した。*LHCB* 遺伝子群の遺伝子発現量は、WT と *lhy;cca1* 間で有意な差がないことを RT-PCR 法及び qRT-PCR 法により確認した。また、LHCII の局在場所である葉緑体グラナの重層数が顕著に増加していることを見出した。*phyB* 変異は *lhy;cca1* の光周期依存的なクロロフィル含量及び *a/b* 比の変化を抑圧しなかったが、*svp* 変異では顕著な抑圧が観察された。以上の結果から、「概日時計によるクロロフィル含量及び *a/b* 比の光周期補償性制御」には SVP が主要な役割を果たすが、PHYB はこの経路とは独立に機能することが分かった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、モデル植物であるシロイヌナズナを研究対象として、概日時計による光合成色素クロロフィルの量的・質的制御に関する分子メカニズムの一端を世界ではじめて明らかにしたものである。概日時計機能が著しく低下した *lhy;cca1* 変異体では、クロロフィル量とクロロフィル *a/b* 比が光周期依存的に変動することを発見した。一方、野生型ではこのような変動は観察されず、ほぼ一定値を示すことを見出し、光周期補償性と定義した。詳細な細胞生物学的研究及び生化学的研究により、上記の *lhy;cca1* におけるクロロフィル量とクロロフィル *a/b* 比の変動は、光合成機能発現に必須な LHCII タンパク質量と葉緑体内膜系グラナのスタック数の変化によるものであることを見出した。今回の発見は、モデル植物シロイヌナズナの野生型が、さまざまな光周期のもとでクロロフィル量及びクロロフィル *a/b* 比をほぼ一定に保つ機構（光周期補償性）において、概日時計因子（LHY と CCA1）及び MADS box 型転写因子（SVP）が重要な働きを有することを示すことにより、他生物種を含めて光周期・概日時計機構に関する研究を先導するものといえる。

平成 24 年 1 月 12 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。